

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
30. August 2001 (30.08.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/62781 A2**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C07K 14/415** (74) Anwalt: **BIEBERBACH, Andreas; BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).**
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP01/01720**
- (22) Internationales Anmeldedatum: **16. Februar 2001 (16.02.2001)**
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch**
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
- (30) Angaben zur Priorität:  
100 09 002.8 25. Februar 2000 (25.02.2000) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **SUNGENE GMBH & CO. KGaA [DE/DE]; 06468 Gatersleben (DE).**
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **HERBERS, Karin [DE/DE]; Am Hange 6, 06484 Quedlinburg (DE). BADUR, Ralf [DE/DE]; Von Eckenbrecher Weg 2, 38642 Goslar (DE). KUNZE, Irene [DE/DE]; Mühlenweg 11, 06466 Gatersleben (DE). SOMMER, Susanne [DE/DE]; Brechstr. 8, 06484 Quedlinburg (DE). LEMKE, Rainer [DE/DE]; Halberstaedter Str. 14, 06484 Quedlinburg (DE). GEIGER, Michael [DE/DE]; Neuer Weg 15, 06484 Quedlinburg (DE).**
- (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



(54) Titel: HOMOGENITISATE PHYTYL TRANSFERASE

(54) Bezeichnung: HOMOGENITISATPHYTYLTRANSFERASE

(57) Abstract: The invention relates to nucleic acid sequences which code for a protein with homogenitise phytol transferase activity, to the use of these nucleic acid sequences for producing transgenic organisms such as transgenic plants with an increased tocopherol and tocotrienol content, to a method for producing plants with an increased tocopherol and/or tocotrienol content, and to the transgenic plants themselves.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Nukleinsäuresequenzen kodierend ein Protein mit Homogenitatphytyltransferase-Aktivität, die Verwendung der Nukleinsäuren zur Herstellung von transgenen Organismen, wie beispielsweise transgenen Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen und Tocotrienolen, ein Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen und/oder Tocotrienolen, sowie die transgenen Pflanzen selbst.

**WO 01/62781 A2**

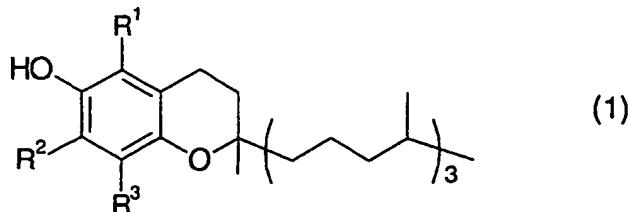
The PTO did not receive the following items(s) PCT/EP01/01720  
of the sequence listing

**Homogentisatphytyltransferase****Beschreibung**

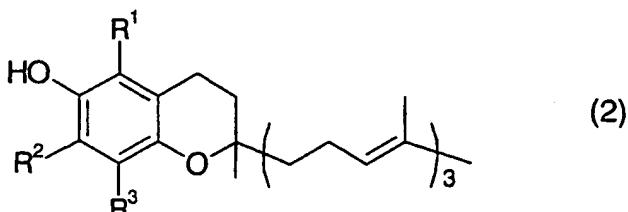
5

- Die Erfindung betrifft Nukleinsäuresequenzen kodierend ein Protein mit Homogentisatphytyltransferase-Aktivität, die Verwendung der Nukleinsäuren zur Herstellung von transgenen Organismen, wie beispielsweise transgenen Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen und/oder Tocotrienolen, ein Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen und Tocotrienolen, sowie die transgenen Organismen, wie beispielsweise transgene Pflanzen selbst.
- 10 15 Die in der Natur vorkommenden acht Verbindungen mit Vitamin E-Aktivität sind Derivate des 6-Chromanols (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). Die Gruppe der Tocopherole (1a-d) weist eine gesättigte Seitenkette auf, die Gruppe 20 der Tocotrienole (2a-d) eine ungesättigte Seitenkette:

25

1a,  $\alpha$ -Tocopherol:  $R^1 = R^2 = R^3 = CH_3$ 30 1b,  $\beta$ -Tocopherol [148-03-8]:  $R^1 = R^3 = CH_3$ ,  $R^2 = H$ 1c,  $\gamma$ -Tocopherol [54-28-4]:  $R^1 = H$ ,  $R^2 = R^3 = CH_3$ 1d,  $\delta$ -Tocopherol [119-13-1]:  $R^1 = R^2 = H$ ,  $R^3 = CH_3$ 

35



40

2a,  $\alpha$ -Tocotrienol [1721-51-3]:  $R^1 = R^2 = R^3 = CH_3$ 2b,  $\beta$ -Tocotrienol [490-23-3]:  $R^1 = R^3 = CH_3$ ,  $R^2 = H$ 2c,  $\gamma$ -Tocotrienol [14101-61-2]:  $R^1 = H$ ,  $R^2 = R^3 = CH_3$ 2d,  $\delta$ -Tocotrienol [25612-59-3]:  $R^1 = R^2 = H$ ,  $R^3 = CH_3$ 

45

In der vorliegenden Erfindung werden unter Vitamin E alle acht vorstehend erwähnten Tocopherole und Tocotrienole mit Vitamin-E-Aktivität verstanden.

- 5 Diese Verbindungen mit Vitamin-E-Aktivität sind wichtige natürliche fett-lösliche Antioxidantien. Ein Mangel an Vitamin E führt bei Menschen und Tieren zu pathophysiologischen Situationen. Vitamin E-Verbindungen haben daher einen hohen wirtschaftlichen Wert als Zusatzstoffe im Food- und Feed-Bereich, in pharmazeutischen Formulierungen und in kosmetischen Anwendungen.
- 10

Ein wirtschaftliches Verfahren zur Herstellung von Vitamin E-Verbindungen sowie Nahrungs- und Futtermittel mit erhöhtem Vitamin E-Gehalt sind daher von großer Bedeutung.

15

Besonders wirtschaftliche Verfahren sind biotechnologische Verfahren, die Proteine und Biosynthesegene der Tocopherol- bzw. Tocotrienol-Biosynthese aus Vitamin-E-produzierenden Organismen nutzen.

20

Abbildung 5 zeigt ein Biosyntheseschema von Tocopherolen und Tocotrienolen.

Im Verlauf der Biosynthese wird Homogentisinsäure (Homogentisat) 25 an Phytolpyrophosphat (PPP) bzw. Geranylgeranylpyrophosphat gebunden, um die Vorläufer von  $\alpha$ -Tocopherol und  $\alpha$ -Tocotrienol, das 2-Methyl-phytolhydrochinon bzw. das 2-Methyl-geranylgeranylhydrochinon zu bilden. Durch Methylierungsschritte mit S-Adenosyl-methionin als Methyl-Gruppen-Donor entsteht zunächst 2,3-Dimethyl-6-phytolhydrochinon, dann durch Zyklisierung  $\gamma$ -Tocopherol 30 und durch nochmalige Methylierung  $\alpha$ -Tocopherol.

Katani et al., Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol, 1998, 49, 151 bis 157, beschreiben die genomische Gesamtsequenz des 35 Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC6803.

Über die Erhöhung des Metabolitflusses zur Steigerung des Tocopherol- bzw. Tocotrienolgehaltes in transgenen Organismen, beispielsweise in transgenen Pflanzen durch Überexpression einzelner 40 Biosynthesegene ist bisher wenig bekannt.

WO 97/27285 beschreibt eine Modifikation des Tocopherol-Gehaltes durch verstärkte Expression bzw. durch Herunterregulation des Enzyms p-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (HPPD).

45

WO 99/04622 beschreibt Gensequenzen codierend für eine  $\gamma$ -Tocopherolmethyltransferase aus Synechocystis PCC6803 und Arabidopsis thaliana und deren Einbau in transgene Pflanzen.

5 WO 99/23231 zeigt, daß die Expression einer Geranylgeranyl-Reductase in transgenen Pflanzen eine gesteigerte Tocopherol-biosynthese zur Folge hat.

Der Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, ein weiteres Biosynthesegen des Vitamin-E-Biosyntheweges und damit weitere vorteilhafte transgene Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen und Tocotrienolen zur Verfügung zu stellen.

Die Aufgabe wurde durch Auffinden von Nukleinsäuresequenzen, 15 codierend eine Homogentisatphytyltransferase und durch Überexpression des Homogentisatphytyltransferase-Gens in Pflanzen gelöst.

Dementsprechend betrifft die vorliegende Erfindung Proteine, 20 die die Aktivität einer Homogentisatphytyltransferase (HGPT) aufweisen, also die Fähigkeit Phytolpyrophosphat an Homogentisat zu binden, also beispielsweise eine enzymatische Aktivität zur Umwandlung von Homogentisat und Phytolpyrophosphat in 2-Methyl-phytylhydrochinon aufweisen.

25 Bevorzugte 2-Methyl-phytylhydrochinone sind 2-Methyl-6-phytylhydrochinon oder 2-Methyl-5-phytylhydrochinon. / /

Unter Homogentisatphytyltransferasen werden im folgenden die 30 erfindungsgemäßen Proteine verstanden.

Bevorzugte Proteine weisen die enzymatische Aktivität zur Umwandlung von Homogentisat und Phytolpyrophosphat in 2-Methyl-phytylhydrochinon auf und enthalten die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2 35 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Homologie von mindestens 20 %, bevorzugt 40 %, vorzugsweise mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO. 2 aufweist.

40 Weitere Beispiele für die erfindungsgemäßen Proteine lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz bekannt ist, wie beispielsweise aus Arabidopsis thaliana durch Homologievergleich der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID. NO. 2 leicht auffinden.

## 4

Die erfindungsgemäßen Proteine können als Homogentisatphytyltransferasen verwendet werden.

Für alle erfindungsgemäßen Verwendungen der erfindungsgemäßen Proteine sind die bevorzugten Proteine bevorzugt.

## 5

Unter Substitution ist der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die 10 ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini 15 des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere 20 Aminosäuren ersetzt wird.

Unter Homologie zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinfänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP 25 (UWGCG, University of Wisconsin, Genetic Computer Group) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight:	12
Length Weight:	4
30 Average Match:	2,912
Average Mismatch:	-2,003

Unter einem Protein, das eine Homologie von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO.2 aufweist, 35 wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO.2 nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 20 % aufweist.

40 Die erfindungsgemäßen Homogentisatphytyltransferasen sind in der Lage Homogentisatderivate und Phytylpyrophosphat-Derivate in 2-Methyl-Phytylhydrochinonderivate und/oder Homogentisatderivate und Geranyl-Geranyl-pyrophosphatderivate in 2-Methyl-geranyl-geranylhydrochinonderivate zu überführen.

45

## 5

Unter Homogentisatderivaten werden Homogentisat und davon abgeleitete Homogentisatverbindungen verstanden, die von den erfundungsgemäßen Homogentisatphytyltransferasen als Substrat akzeptiert werden.

5

Unter Phytylpyrophosphat-Derivaten werden Phytylpyrophosphat und davon abgeleitete Phytylpyrophosphatverbindungen verstanden, die von den erfundungsgemäßen Homogentisatphytyltransferasen als Substrat akzeptiert werden.

10

Unter 2-Methyl-Phytylhydrochinonderivaten werden dementsprechend die resultierenden Verbindungen der enzymatischen Umsetzung verstanden, wie beispielsweise 2-Methyl-Phytylhydrochinon und die entsprechenden abgeleiteten Verbindungen.

15

Bevorzugte 2-Methyl-phytylhydrochinonderivate sind Derivate des 2-Methyl-6-phytylhydrochinon oder 2-Methyl-5-phytyllhydrochinon.

Unter Geranyl-Geranyl-pyrophosphatderivaten werden Geranyl-  
20 Geranyl-pyrophosphat und davon abgeleitet. Geranyl-Geranyl-  
pyrophosphatverbindungen verstanden, die von den erfundungs-  
gemäßen Homogentisatphytyltransferasen als Substrat akzeptiert  
werden.

25 Unter 2-Methyl-Geranylgeranylhydrochinonderivaten werden dem-  
entsprechend die resultierenden Verbindungen der enzymatischen  
Umsetzung verstanden, wie beispielsweise 2-Methyl-geranylgeranyl-  
hydrochinon und die entsprechenden abgeleiteten Verbindungen.

30 Bevorzugte 2-Methyl-Geranylgeranylhydrochinone sind 2-Methyl-  
6-Geranylgeranylhydrochinon oder 2-Methyl-5-Geranylgeranylhydro-  
chinon.

Bevorzugte 2-Methyl-Geranylgeranylhydrochinonderivate sind  
35 Derivate des 2-Methyl-6-Geranylgeranylhydrochinon oder 2-Methyl-  
5-Geranylgeranylhydrochinon.

Dementsprechend betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Bio-  
transformation, dadurch gekennzeichnet, daß man Homogentisat-  
40 derivate und Phytylpyrophosphat-Derivate in 2-Methyl-Phytylhydro-  
chinonderivate oder Homogentisatderivate und Geranyl-Geranyl-  
pyrophosphatderivate in 2-Methyl-geranylgeranylhydrochinon-  
derivate in Gegenwart einer erfundungsgemäßen Homogentisatphytyl-  
transferase überführt.

45

## 6

Die Biotransformation läßt sich prinzipiell mit ganzen Zellen, die das Enzym HGPT exprimieren oder Zellextrakten aus diesen Zellen oder aber mit aufgereinigter oder hochreiner HGPT durchführen. Die Homogentisatphytyltransferase kann dabei auch in 5 freier oder in immobilisierter Form vorliegen.

Die erfindungsgemäßen Homogentisatphytyltransferasen können ferner zur Herstellung von Vitamin E verwendet werden. Der enzymatische Biosyntheseschritt Schritt der Homogentisatphytyl-10 transferasen kann dabei in vitro oder wie nachstehend beschrieben in vivo, beispielsweise in transgenen Organismen, wie beispielsweise in transgenen Pflanzen erfolgen.

Dementsprechend betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Vitamin E, dadurch gekennzeichnet, daß man Homogen-15 tisatderivate und Phytyl-Pyrophosphat-Derivate in 2-Methyl-Phytylhydrochinonderivate oder Homogentisatderivate und Geranyl-Geranyl-Pyrophosphatderivate in 2-Methyl-geranylgeranylhydro-chinonderivate in Gegenwart erfindungsgemäßen Homogentisatphytyl-20 transferase überführt.

Der Biosyntheseweg von Vitamin E bietet weiterhin Targetenzyme für die Entwicklung von Inhibitoren. Da sich nach heutigem Stand der Technik kein mit der *Synechocystis* HGPT identisches oder 25 ähnliches Enzym in humanen und tierischen Organismen befindet, ist davon auszugehen, daß Inhibitoren sehr spezifisch auf Pflanzen wirken.

Daher betrifft die Erfindung auch die Verwendung der erfindungs-30 gemäßen Homogentisatphytyltransferase als herbizides Target zum Auffinden von Inhibitoren der Homogentisatphytyltransferase.

Die HGPT ist ein Target für Herbizide. Um effiziente Hemmstoffe der HGPT finden zu können, ist es notwendig, geeignete Test-35 systeme, mit denen Inhibitor-Enzym-Bindungsstudien durchgeführt werden können, zur Verfügung zu stellen. Hierzu wird beispielsweise die komplette cDNA-Sequenz der HGPT aus *Synechocystis* in einen Expressionsvektor (pQE, Qiagen) kloniert und in *E. coli* überexprimiert.

40

Das mit Hilfe der erfindungsgemäßen Expressionskassette exprimierte HGPT-Protein eignet sich besonders zur Auffindung von für die HGPT spezifischen Hemmstoffen.

45 Dementsprechend betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Auffinden von Inhibitoren der Homogentisatphytyltransferase, dadurch gekennzeichnet, daß man die enzymatische Aktivität der Homogen-

tisatphytyltransferase in Gegenwart einer chemischen Verbindung misst und bei Erniedrigung der enzymatischen Aktivität im Vergleich zur nicht gehemmten Aktivität die chemische Verbindung einen Inhibitor darstellt.

5

Dazu kann die HGPT beispielsweise in einem Enzymtest eingesetzt werden, bei dem die Aktivität der HGPT in An- und Abwesenheit des zu testenden Wirkstoffs ermittelt wird. Aus dem Vergleich der beiden Aktivitätsbestimmungen lässt sich eine qualitative und 10 quantitative Aussage über das Hemmverhalten des zu testenden Wirkstoffes machen.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems kann eine Vielzahl von chemischen Verbindungen schnell und einfach auf herbizide 15 Eigenschaften überprüft werden. Das Verfahren gestattet es, reproduzierbar aus einer großen Anzahl von Substanzen gezielt solche mit großer Wirkstärke auszuwählen, um mit diesen Substanzen anschließend weitere, dem Fachmann geläufige vertiefte Prüfungen durchzuführen.

20

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind deshalb herbizide Wirkstoffe, die mit dem oben beschriebenen Testsystem identifizierbar sind.

25 Die erfindungsgemäßen Homogentisatphytyltransferasen lassen sich, wie nachstehend beschrieben durch Genexpression der entsprechenden Nukleinsäuren, die diese Proteine kodieren, aus natürlichen oder genetisch veränderten Organismen herstellen.

30 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Nukleinsäuren, im folgenden Homogentisatphytyltransferase-Gene (HGT-Gene) genannt, die die vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Proteine kodieren.

35 Die Nukleinsäuresequenz kann beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein. Zur Insertion in ein Nukleinsäurekonstrukt, wie beispielsweise eine Expressionskassette, geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine HGPT kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherolen und/oder Tocotrienolen verleihen.

40 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

45 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der Organismus spezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen

anderer, bekannter Gene des betreffenden Organismus leicht ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in einer Pflanze exprimiert 5 werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Pflanze bei der Rückübersetzung zu verwenden.

Bevorzugte Nukleinsäuren codieren eine pflanzliche Homogentisatphytyltransferase oder eine Homogentisatphytyltransferase aus 10 Cyanobakterien.

Eine besonders bevorzugte Nukleinsäure hat die Sequenz SEQ ID NO. 1. Diese Nukleinsäure stellt eine prokaryontische genomische DNA aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803 15 dar, die die Homogentisatphytyltransferase der Sequenz SEQ ID NO. 2 codiert.

Alle vorstehend erwähnten Homogentisatphytyltransferase-Gene sind in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den 20 Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press 25 New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor 30 Laboratory Press, beschrieben.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen HGPT oder der erfindungsgemäßen HGPT-Gene zur Herstellung von Antikörpern.

35 Die Erfindung betrifft weiterhin Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine der vorstehend beschriebenen, erfindungsgemäßen Homogentisatphytyltransferase-Gene, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, 40 die die Transkription und Translation in prokaryontischen oder eukaryontischen Organismen gewährleisten.

Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden 45 und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigent-

lichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so daß die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Nukleinsäurekonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein,  
5 das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die vorstehend erwähnten Homogentisatphytyltransferase-Gene inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Stattdessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, daß keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression  
10 gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können auch allein vor die natürlichen Gene zur Steigerung der Aktivität gebracht werden.

Das Nukleinsäurekonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch  
15 eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nucleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren.  
20 Die vorstehend erwähnten Homogentisatphytyltransferase-Gene können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Bevorzugt werden Nukleinsäurekonstrukte verwendet, die die  
25 Expression des erfindungsgemäßen Homogentisatphytyltransferase-Gens in einer Wirtszelle ermöglichen, im folgenden auch Expressionskassette genannt.

Die Expressionskassetten beinhalten regulative Nukleinsäure-  
30 sequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere  
35 regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das homogentisatphytyltransferase-Gen funktionell verknüpft sind.

Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man die  
40 sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten  
45 Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER),

10

im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693-8711).

5

Je nach nachstehend näher beschriebenen Wirtsorganismus oder Ausgangsorganismus der durch Einbringen der Expressionskassette in einen genetisch veränderten oder transgenen Organismus überführt wird, eignen sich verschiedene Regulationssequenzen.

10

Vorteilhafte Regulationssequenzen für die erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte, für das nachstehend beschriebene Verfahren zur Herstellung von Vitamin E und für die nachstehend beschrieben genetisch veränderten Organismen sind beispielsweise 15 in Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, l-PR- oder im l-PL-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden.

20 Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MFa , AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH oder in den Pflanzenpromotoren CaMV/35S [Franck et al., Cell 21(1980) 285-294], PRP1 [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 25 (1993)], SSU, OCS, leb4, usp, STLS1, B33, nos oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor enthalten.

Für Pflanzen als genetisch veränderte Organismen ist als Promotor der Expressionskassette grundsätzlich jeder Promotor geeignet, 30 der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann.

Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumen-35 kohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202). 40 Die Expressionskassette kann auch einen pathogen- oder chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen Homogentisatphytyltransferase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann.

45 Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzene-

## 11

sulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor 5 können beispielsweise verwendet werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vor- 10 stufen stattfindet oder in denen die Produkte vorteilhafterweise akkumuliert werden.

Insbesondere zu nennen sind Promotoren für die ganze Pflanze aufgrund konstitutiver Expression, wie beispielsweise der CaMV 15 Promotor, der OCS Promotor aus Agrobacterium (Octopin Synthase), der NOS Promotor aus Agrobacterium (Nopaline synthase), der Ubiquitin Promotor, Promotoren vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines Prolin-reichen Proteins aus Weizen (Weizen WO 9113991)

20 Weiterhin insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blatt-spezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO9705900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphat 25 carboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-245).

Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise

30 spezifische Promotoren für Knollen, Speicherwurzeln oder Wurzeln, wie beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33), der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel, der Promotor der Stärke Synthase (GBSS1) oder der Sporamin Promotor,

35 fruchtspezifische Promotoren, wie beispielsweise der frucht-spezifische Promotor aus Tomate (EP409625),

fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 9421794),

40 blütenspezifische Promotoren, wie beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO9216635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO9822593) oder

45 spezifische Plastiden- oder Chromoplasten-Promotoren, wie beispielsweise der RNA-Polymerase Promotor (WO9706250) oder

## 12

Auch der Promotor der Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase aus Glycine max (siehe auch Genbank Accession Nummer U87999) oder ein anderer Nodien-spezifischer Promotor wie in EP 249676 können vorteilhaft verwendet werden.

5

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

10

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in ein Derivat des Transformationsvektors pBin-19 mit 35s Promotor (Bevan, M., Nucleic Acids Research 12: 8711-8721 (1984)) eingebaut werden. Abbildung 2 zeigt ein Derivat des Transformationsvektors pBin -19 mit samenspezifischem Legumin B4-Promotor.

Die Expressionskassette kann beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-Promotor (US 5504200), den USP- (Baumlein, H. et al., Mol. Gen. Genet.

20 (1991) 225 (3), 459-467), den Bce4-Gen Promotor aus Brassica (WO 9113980) oder LEB4-Promotor (Fiedler und Conrad, 1995)), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten.

25 Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt beispielsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten HGPT-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und HGPT-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungs-

30 rungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with

35 Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

40 Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den Plastiden gewährleisten.

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz beispielsweise für ein HGPT-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Trans-

lokation des HGPT-Gens in die Chloroplasten vom HGPT-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Nicotiana tabacum Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid 5 der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist.

Besonders bevorzugt sind DNA-Sequenzen von drei Kassetten des 10 Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

**pTP09**  
**15** KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTGTC  
 CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTTCCCTTCTCTCACTTTTCCGGCCTTAA  
 ATCCAATCCAATATCACCACCTCCGCCCGTACTCCTCCTCCGCCGCCGCCGTGCG  
 TAAGGTACCGGCGATTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAAGAGAAA  
**20** TCC\_BamHI

**pTP10**  
**25** KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTGTC  
 CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTTCCCTTCTCTCACTTTTCCGGCCTTAA  
 ATCCAATCCAATATCACCACCTCCGCCCGTACTCCTCCTCCGCCGCCGCCGTGCG  
 TAAGGTACCGGCGATTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAAGAGAAA  
**30** GATCC\_BamHI

**30 pTP11**  
**35** KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTGTC  
 CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTTCCCTTCTCTCACTTTTCCGGCCTTAA  
 ATCCAATCCAATATCACCACCTCCGCCCGTACTCCTCCTCCGCCGCCGCCGTGCG  
 TAAGGTACCGGCGATTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAAGAGAAA  
**40** ATCC\_BamHI

Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine HGPT kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine 40 Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen HGPT-Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten 45 Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette

können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz die für ein HGPT-Gen codiert und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus Agrobacterium tumefaciens, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein HGPT-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder

Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression eines HGPT-Gens enthalten.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte können zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen verwendet werden. Die Herstellung der genetisch veränderten Organismen erfolgt durch Transformation der Wirtsorganismen, im folgenden auch Ausgangsorganismen bezeichnet, mit einem das HGPT-Gen enthaltenden Konstrukt.

Unter Ausgangs- oder Wirtsorganismen werden prokaryontische oder eukaryontische Organismen, wie beispielsweise Mikroorganismen, Moose oder Pflanzen verstanden. Bevorzugte Mikroorganismen sind Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

Bevorzugte Bakterien sind Bakterien der Gattung Escherichia, Erwinia, Agrobacterium, Flavobacterium, Alcaligenes oder Cyano-bakterien der Gattung Synechocystis.

Bevorzugte Hefen sind Candida, Saccharomyces, Hansenula oder Pichia.

Bevorzugte Pilze sind Aspergillus, Trichoderma, Ashbya, Neurospora, Fusarium oder weitere in Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze.

Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung Haematococcus, Phaeodactylum tricornatum, Volvox oder Dunaliella.

Die Erfindung betrifft einen genetisch veränderten Organismus, wobei die genetische Veränderung die Genexpression einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure gegenüber einem Wildtyp

für den Fall, daß der Ausgangsorganismus eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthält, erhöht oder

für den Fall, daß der Ausgangsorganismus eine erfindungsgemäße Nukleinsäure nicht enthält, verursacht.

## 16

Die transgenen Organismen, enthaltend das erfindungsgemäße HGPT-Gen sind in der Lage Homogentisatderivate und Phytylpyrophosphat-Derivate in 2-Methyl-Phytylhydrochinonderivate und/oder Homogen-tisatderivate und Geranyl-Geranyl-pyrophosphatderivate in 5 2-Methyl-geranylgeranylhydrochinonderivate zu überführen.

Diese Organismen können beispielsweise zur vorstehend beschriebenen Biotransformation verwendet werden.

- 10 Transgene Organismen, enthaltend ein exogenes erfindungsgemäßes HGPT-Gen, die bereits als Ausgangsorganismen die Biosynthesegene zur Herstellung von Vitamin E besitzen, wie beispielsweise Pflanzen oder weitere photosynthetisch aktive Organismen wie beispielsweise Cyanobakterien, Moose oder Algen, weisen einen 15 erhöhten Gehalt an Tocopherolen und/oder Tocotrienolen im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp auf.

Die Erfindung betrifft daher einen solchen erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Organismus, der gegenüber dem Wildtyp 20 einen erhöhten Vitamin E-Gehalt aufweist.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen HGPT oder der erfindungsgemäßen HGPT-Gene zur Herstellung von Vitamin E in transgenen Organismen.

- 25 Erfindungsgemäße, genetisch veränderte Organismen, vorzugsweise Pflanzen die gegenüber dem Wildtyp einen erhöhten Vitamin E-Gehalt aufweisen können zur Herstellung von Vitamin E verwendet werden.

- 30 Daher betrifft die vorliegende Erfindung auch Verfahren zur Herstellung von Vitamin E indem man einen erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismus, vorzugsweise eine erfindungsgemäß genetisch veränderte Pflanze, der gegenüber dem Wildtyp 35 einen erhöhten Vitamin E-Gehalt aufweist kultiviert, den Organismus erntet und die Vitamin-E-Verbindungen anschließend aus dem Organismus isoliert.

Von Menschen und Tieren verzehrbarer erfindungsgemäße, genetisch 40 veränderte Pflanzen mit erhöhtem Vitamin-E-Gehalt können auch beispielsweise direkt oder nach an sich bekannter Aufbereitung als Nahrungsmittel oder Futtermittel verwendet werden.

Zur Herstellung von Organismen mit einem erhöhten Vitamin 45 E-Gehalt (Tocopherole und/oder Tocotrienole) im Vergleich zum Wildtyp werden in einer bevorzugten Ausführungsform Pflanzen

als Ausgangsorganismen und dementsprechend auch als genetisch veränderte Organismen verwendet.

Bevorzugte Pflanzen sind beispielsweise Tagetes, Sonnenblume,  
5 Arabidopsis, Tabak, Roter Pfeffer, Soja, Tomate, Aubergine, Paprika, Möhre, Karotte, Kartoffel, Mais, Salate und Kohlarten, Getreide, Alfalfa, Hafer, Gerste, Roggen, Weizen, Triticale, Hirse, Reis, Luzerne, Flachs, Baumwolle, Hanf, Brassicaceen wie beispielsweise Raps oder Canola, Zuckerrübe, Zuckerrohr, Nuß- und  
10 Weinspezies oder Holzgewächse wie beispielsweise Espe oder Eibe.

Besonders bevorzugt sind Arabidopsis thaliana, Tagetes erecta, Brassica napus, Nicotiana tabacum, Canola, Kartoffeln sowie Ölsaaten, wie beispielsweise Soja.

15 Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen in dem man eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Nukleinsäurekonstrukt in das Genom des Ausgangsorganismus einführt.

20 Zur Transformation eines Wirtsorganismus, wie beispielsweise einer Pflanze, mit einer für eine HGPT kodierenden DNA wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA vorzugsweise zusätzliche  
25 funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthalten kann.

Geeignete Vektoren für Pflanzen sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7,  
30 S. 71-119 (1993) beschrieben.

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in  
35 E. coli, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in E. coli als auch in Agrobakterien replizieren können.

40 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID Nr. 1 oder eine mit dieser hybridisierende DNA-Sequenz zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des  
45 Gehaltes an Tocopherolen und/oder Tocotrienolen der Pflanze.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen, Blütenblättern oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile  
5 sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen, Moosen und Algen mit dem Ziel einer Erhöhung des Gehaltes  
10 an Tocopherolen und/oder Tocotrienolen eingesetzt werden.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus  
15 Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplasten- transformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation  
20 trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic  
25 Press (1993), 128-143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225) beschrieben.  
Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res.  
30 12 (1984), 8711).

Mit einer Expressionskassette transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in  
35 einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Erhöhung des Gehaltes an Tocopherolen oder Tocotrienolen bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene  
40 Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung dieser Verbindungen durch funktionelle Überexpression eines erfindungsgemäßen HGPT-Gens in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze.

Dabei kann sowohl der Gehalt an Tocopherolen oder Tocotrienolen gesteigert werden. Vorzugsweise wird der Gehalt an Tocopherolen gesteigert. Aber es ist auch möglich unter bestimmten Bedingungen vorzugsweise den Gehalt an Tocotrienolen zu steigern.

5

Der Biosyntheseort von Tocopherolen beispielsweise ist unter anderem das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des HGPT-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Tocopherol-Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein 10 muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - besonders in fetthaltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen HGPT-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare 15 Expression wünschenswert erscheinen.

Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten HGPT-Gens kann beispielsweise *in vitro* durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte 20 Expression des HGPT-Gens und deren Auswirkung auf die Tocopherol-Biosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, trans-25 formiert mit einer Expressionskassette enthaltend ein erfindungsgemäßes HGPT-Gen, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen.

Bevorzugt sind dabei, wie vorstehend erwähnt, transgene Pflanzen, 30 wie beispielsweise Tagetes, Sonnenblume, Arabidopsis, Tabak, Roter Pfeffer, Soja, Tomate, Aubergine, Paprika, Möhre, Karotte, Kartoffel, Mais, Salate und Kohlarten, Getreide, Alfalfa, Hafer, Gerste, Roggen, Weizen, Triticale, Hirse, Reis, Luzerne, Flachs, Baumwolle, Hanf, Brassicacaen wie beispielsweise Raps oder 35 Canola, Zuckerrübe, Zuckerrohr, Nuß- und Weinspezies oder Holzgewächse wie beispielsweise Espe oder Eibe

Pflanzen im Sinne der Erfindung sind mono- und dikotyle Pflanzen.

40 Gegenstand der Erfindung sind weiterhin weitere photosynthetisch aktive Organismen transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend ein erfindungsgemäßes HGPT-Gen.

Durch Überexpression der für eine erfindungsgemäß HGPT 45 kodierenden Gensequenz in einer Pflanze wird zusätzlich zum erhöhten Vitamin E-Gehalt eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der HGPT erreicht.

## 20

Der Erfindung betrifft daher einen erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismus, vorzugsweise eine erfindungsgemäß genetisch veränderte Pflanze die gegenüber Inhibitoren der Homogentisatphytyltransferase eine Resistenz aufweist.

5

Durch die vorliegende Erfindung gelingt es beispielsweise in transgenen Pflanzen die Aktivität der Homogentisatphytyltransferase (HGPT) durch Überexpression des erfindungsgemäßen HGPT-Gens zu erhöhen. Dies kann prinzipiell durch Expression 10 homologer oder heterologer HGPT-Gene erreicht werden.

In Beispiel 1 wird erstmals die Klonierung einer HGPT-DNA-Sequenz (SEQ-ID Nr. 1) aus *Synechocystis spec. PCC 6803* beschrieben. Um eine Plastidenlokalisierung zu gewährleisten wird der HGPT- 15 Nukleotidsequenz aus *Synechocystis* eine Transitsignalsequenz (Abb. 1-4) vorangestellt.

Das durch die zusätzliche Expression des HGPT-Gens nun vermehrt zur Verfügung stehende 2-Methyl-Phytylhydrochinon bzw. 2-Methyl- 20 Geranylgeranylhydrochinon wird weiter in Richtung Tocopherole und Tocotrienol umgesetzt (Abbildung 5).

Messungen an HGPT *Synechocystis* knock out Mutanten ergaben bezüglich des Gehaltes an Tocopherolen eine drastische Abnahme. 25 Dies belegt den direkten Einfluß der plastidären pflanzlichen HGPT auf die Synthese von Tocopherolen und Tocotrienolen.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

30 - Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend ein erfindungsgemäßes HGPT-Gen in eine Pflanzenzelle oder Protoplasten von Pflanzen einbringt und diese zu ganzen Pflanzen regeneriert.

35

- Verwendung des erfindungsgemäßes HGPT-Gen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen und/oder Tocotrienolen durch Expression einer HGPT DNA-Sequenz in Pflanzen.

40

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

45 Allgemeine Bedingungen:  
Sequenzanalyse rekombinanter DNA

## 21

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

5

## Beispiel 1

Klonierung der Homogentisatphytyltransferase aus *Synechocystis* spec. PCC 6803.

- 10 Die DNA kodierend für den ORF slr1736 wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Synechocystis* spec. PCC 6803 gemäß der Methode nach Crispin A. Howitt (BioTechniques 21:32-34, July 1996) unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (slr17365' Abbildung 8, SEQ ID NO. 3) und eines antisense 15 spezifischen Primers (slr17363', Abbildung 9, SEQ ID NO. 4) amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

- Die PCR erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz in dem enthalten 20 war:

- 5 µl einer *Synechocystis* spec. PCC 6803 Zellsuspension
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg (OAc)<sub>2</sub>
- 25 - 5 µg Rinderserum-Albumin
- 40 pmol slr17365'
- 40 pmol slr17363'
- 15 µl 3,3× rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
- 30 - 5 U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)  
35 Schritt 2: 3 Sekunden 94°C  
Schritt 3: 2 Minuten 48°C (Annealing)  
Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)  
35 Wiederholungen der Schritte 2-4  
Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)  
40 Schritt 6: 4°C (Warteschleife)

Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-T (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons wurde durch Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) Primers bestätigt.  
45

Beispiel 2  
Erzeugung einer slr1736 Knock out Mutante.

Ein DNA Konstrukt zur Erzeugung einer Deletionsmutante des ORF  
5 slr1736 in Synechocystis spec. PCC 6803 wurde unter Anwendung  
von Standard Klonierungstechniken erzeugt.

Der Vektor pGEM-T/slr1736 wurde unter Verwendung des Restriktionsenzyms HpaI verdaut. Durch diesen Verdau wird ein 348 Bp  
10 umfassendes internes Fragment des slr1736 deletiert. In die HpaI Schnittstellen wurde anschließend die Aminoglycosid-3' Phosphotransferase des Transposons Tn903 kloniert. Dazu wurde das Tn903 als EcoR1 Fragment aus dem Vektor pUC4k (Vieira, J und Messing, J., Gene:19, 259-268, 1982) isoliert, die überstehenden Enden des  
15 Restriktionsverdaus nach Standardmethoden in glatte Enden überführt und in den HpaI geschnittenen Vektor pGEM-T/slr1736 ligiert. Der Ligationsansatz wurde zur Transformation von *E.coli* X11 blue Zellen verwendet. Transformanden wurden durch Verwendung von Kanamycin und Ampicillin selektioniert. Ein rekombinantes  
20 Plasmid (pGEM-T/slr1736::tn903, siehe Abb. 6) wurde isoliert und zur Transformation von Synechocystis spec. PCC 6803 gemäß der Methode nach Williams (Methods Enzymol. 167:776-778, 1987) eingesetzt.

25 Abbildung 6 zeigt ein Konstrukt zur Knock-out Mutagense des ORF slr1736 in Synechocystis spec. PCC 6803.

Synechocystis spec. PCC 6803 Transformanden wurden selektioniert auf Kanamycin haltigem (km) BG-11 Festmedium (Castenholz, Methods  
30 in Enzymology, 68-93, 1988) bei 28°C und 30 µmol Photonen × (m<sup>2</sup> × s)<sup>-1</sup>. Vier unabhängige Knock out Mutanten konnten nach fünf Selektionsrunden (Passagen von Einzelkolonien auf frisches BG-11 km Medium) erzeugt werden.

35 Der vollständige Verlust des slr1736 Endogens bzw. der Austausch gegen die rekombinante slr1736::tn903 DNA, wurde durch PCR Analysen bestätigt.

Beispiel 3  
40 Vergleich der Tocopherolproduktion in Synechocystis spec. PCC 6803 Wildtypzellen und den erzeugten Knock out Mutanten des ORF slr1736

Die auf den BG-11 km Agarmedium kultivierten Zellen der vier  
45 unabhängigen Synechocystis spec. PCC 6803 Knock out Mutanten des ORF slr1736 sowie untransformierte Wildtypzellen wurden zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet. Diese Kulturen wurden bei

- 28°C und 30 µmol Photonen × (m<sup>2</sup> × s)<sup>-1</sup> (30 µE) für ca. 3 Tage kultiviert. Nach Bestimmung der OD<sub>730</sub> der einzelnen Kulturen, wurde die OD<sub>730</sub> aller Kulturen durch entsprechende Verdünnungen mit BG-11 (Wildtypen) bzw. BG-11 km (Mutanten) synchronisiert.
- 5 Diese auf Zelldichte synchronisierten Kulturen wurden zum Animpfen von drei Kulturen pro Mutante bzw. der Wildtypkontrollen verwendet. Die biochemischen Analysen konnten somit unter Verwendung von jeweils drei unabhängig gewachsenen Kulturen einer Mutante und der entsprechenden Wildtypen durchgeführt werden.
- 10 Die Kulturen wurden bis zu einer optischen Dichte von OD<sub>730</sub>=0,3 angezogen. Das Medium der Zellkultur wurde durch zweimalige Zentrifugation bei 14000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge entfernt. Der daran anschließende Aufschluß der Zellen erfolgte durch viermalige Inkubation im Eppendorfschüttler bei 30°C,
- 15 1000 rpm in 100 % Methanol für 15 Minuten, wobei die jeweils erhaltenen Überstände vereinigt wurden. Weitere Inkubations-schritte ergaben keine weitere Freisetzung von Tocopherolen oder Tocotrienolen.
- 20 Um Oxidation zu vermeiden, wurden die erhaltenen Extrakte direkt nach der Extraktion mit Hilfe einer Waters Alliance 2690 HPLC-Anlage analysiert. Tocopherole und Tocotrienole wurden über eine reverse Phase Säule( ProntoSil 200-3-C30, Bischoff) mit einer mobilen Phase von 100 % Methanol getrennt und anhand von
- 25 Standards (Merck) identifiziert. Als Detektionssystem diente die Fluoreszenz der Substanzen (Anregung 295 nm, Emission 320 nm), die mit Hilfe eines Jasco Fluoreszensdetektors FP 920 nachgewiesen wurde.
- 30 In den *Synechocystis* spec. PCC 6803 knock out Mutanten des ORF slr1736 konnten keine Tocopherole gefunden werden. Tocopherole wurden jedoch in den *Synechocystis* spec. PCC 6803 Wildtypzellen gemessen.
- 35 Der Verlust der Fähigkeit zur Produktion von Tocopherolen innerhalb der knock out Mutanten des ORF slr 1736 im Vergleich zu den *Synechocystis* spec. PCC 6803 Wildtypzellen zeigt, daß das Gen slr1736 für eine Homogentisatphytyltransferase kodiert.
- 40 Beispiel 4  
Funktionelle Charakterisierung der Homogentisatphytyltransferase aus *Synechocystis* spec. PCC6803 durch heterologe Expression in *E.coli*.
- 45 Das hypothetische Protein slr1736 aus *Synechocystis* spec. PCC 6803 konnte durch funktionelle Expression in *E.coli* als Homogen-tisatphytyltransferase identifiziert werden.

## 24

- Das aus *Synechocystis spec.* PCC 6803 amplifizierte Gen slr1736 wurde im korrekten Leserahmen in den Expressionsvektor pQE-30 (Qiagen) subkloniert. Die zur Amplifikation des OFR slr1736 aus *Synechocystis spec.* PCC 6803 verwendeten Primer slr17365' bzw. 5' slr17363' (SEQ.-ID Nr. 2 und 3) waren so konstruiert, daß an das 5' Ende und das 3' Ende des Amplikons BamH1 Restriktionsschnittstellen addiert wurden, siehe SEQ.-ID Nr. 1. Das slr1736 Fragment wurde unter Verwendung dieser flankierenden BamH1 Restriktions-schnittstellen aus dem rekombinanten Plasmid pGEM-T/slr1736 isoliert und unter Anwendung von Standardmethoden in einen BamHI geschnittenen pQE-30 ligiert. Der Ligationsansatz wurde zur Transformation von M15 *E.coli* Zellen verwendet und Kanamycin und Ampicillin resistente Transformanden wurden analysiert. Die Kanamycin Resistenz wird durch das in den M15 Zellen enthaltene pREP-4 Plasmid vermittelt. Ein rekombinantes Plasmid (pQE-30/slr1736) welches das slr1736 Fragment in der richtigen Orientierung trug, wurde isoliert. Die Identität und Orientierung des Inserts wurde durch Sequenzierung bestätigt.
- 20 Das rekombinante Plasmid pQE-30/slr1736 wurde zur Transformation von M15 *E.coli* Zellen verwendet, um rekombinantes slr1736 Protein zu erzeugen. Unter Verwendung einer aus der Transformation hervorgegangenen Kolonie wurde eine Übernachtkultur in Luria Broth Medium mit 200 µg/ml Ampicillin (Amp) und 50 µg/ml Kanamycin (Km) 25 angeimpft. Ausgehend von dieser Kultur wurde am nächsten Morgen eine 100 ml Luria Broth Kultur (Amp/Km) angeimpft. Diese Kultur wurde bei 28°C auf einem Schüttelinkubator bis zum erreichen einer OD<sub>600</sub>:0,35-0,4 inkubiert. Anschließend wurde die Produktion des rekombinanten Proteins durch Zugabe von 0,4 mM Isopropyl- 30 β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert. Die Kultur wurde für weitere 3 Stunden bei 28°C geschüttelt und die Zellen anschließend durch Zentrifugation bei 8000 g pelletiert.
- Das Pellet wurde in 600 µl Lysispuffer (ca. 1-1,5 ml /g Pellet 35 Naßgewicht, 10 mM HEPES KOH pH 7,8, 5 mM Dithiothreinol (DTT), 0,24 M Sorbitol) resuspendiert. Anschließend wurde PMSF (Phenyl-methylsulfonat) zu einer Endkonzentration von 0,15 mM beigegeben und der Ansatz für 10 Minuten auf Eis gestellt. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch einen 10 Sekunden Ultraschall-Puls unter 40 Verwendung eines Ultraschallstabes. Nach Zugabe von Triton X100 (Endkonzentration 0,1 %) wurde die Zellsuspension für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend für 30 Minuten bei 25000 xg abzentrifugiert und der Überstand zum Assay eingesetzt.

Die Aktivitätsbestimmung der Homogentisatphytyltransferase erfolgt durch Nachweis von radioaktiv markierten 2-Methyl-phytylhydrochinon als Reaktionsprodukt.

- 5 Dazu wurden 235 µl des Enzyms (ca. 300-600 µg) zusammen mit 35 µl Phytyl-Pyrophosphat und 50 µl (1,2 nmol)  $^3\text{H}$ -Homogentisinsäure in folgendem Reaktionspuffer : 100 µl (250mM) Tricine-NaOH pH 7,6, 100 µl (1,25 mM) Sorbitol, 10 µl (50 mM) MgCl<sub>2</sub> und 20 µl (250 mM) Ascorbat für 4 Stunden bei 25°C inkubiert. Die Tritium markierte 10 Homogentisinsäure liegt in einer ethanolischen Lösung mit 1 mg Ascorbat/ml vor. Davon werden 50 µl eingeengt und der Puffer sowie das Enzym und das Phytyl-Pyrophosphat hinzugegeben.

Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch zweimalige Extraktion 15 des Ansatzes mit Ethylacetat. Die Ethylacetatphasen wurden eingeengt und die Rückstände in Methanol aufgenommen und auf eine Dünnschicht-Platte zur chromatographischen Trennung der Substanzen aufgetragen (feste Phase: HPTLC-Platten:Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merk), flüssige Phase:Toluol). Der Nachweis des radio- 20 aktiv markierten Reaktionsproduktes erfolgt durch Verwendung eines Phosphoimagers.

Diese Experimente bestätigten, daß es sich bei dem durch das Gen slr1736 (SEQ-ID Nr.1) aus Synechocystis spec. PCC 6803 kodierte 25 Protein um eine Homogentisatphytyltransferase handelt, da es die enzymatische Aktivität zur Bildung von 2-Methyl-phytylhydrochinon aus Homogentisate und Phytyl-Pyrophosphat besitzt.

#### Beispiel 5

30 Herstellung von Expressionskassetten enthaltend das HGPT-Gen

Transgene Pflanzen wurden erzeugt, die die Homogentisatphytyl-transferase aus Synechocystis spec. PCC 6803 zum einen unter Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotor des CaMV (Blumenkohl- 35 mosaikvirus) (Franck et al., Cell 21: 285-294, 1980) und zum anderen unter Kontrolle des samenspezifischen Promotors des Legumin Gens aus Vicia faba (Kafatos et al., Nuc. Acid. Res., 14(6):2707-2720, 1986) exprimieren. Die Grundlage des zur konstitutiven Expression der Homogentisatphytyltransferase aus 40 Synechocystis spec. PCC 6803 erzeugten Plasmides war der pBinAR-TkTp-9 (Ralf Badur, Dissertation Universität Göttingen, 1998). Dieser Vektor ist ein Derivat des pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Sci. 66: 221-230, 1990) und enthält den 35S-Promotor des CaMV (Blumenkohlmosaikvirus) (Franck et al., 1980) das 45 Terminationssignal des Octopin-Synthase Gens (Gielen et al., EMBO J. 3: 835-846, 1984) sowie die für das Transitpeptid der Nicotiana tabacum plastidären Transketolase kodierenden DNA

## 26

Sequenz. Die unter Berücksichtigung des korrekten Leserasters erfolgte Klonierung der Homogentisatphytyltransferase aus *Synechocystis spec. PCC 6803* in diesen Vektor, erzeugt eine Translationsfusion der Homogentisatphytyltransferase mit dem 5 plastidären Transitpeptid. Dadurch erfolgt ein Transport des Transgens in die Plastiden.

Zur Erstellung dieses Plasmides wurde das Gen *slr1736* unter Verwendung der flankierenden BamHI Restriktionsschnittstellen aus 10 dem Plasmid pGEM-T/*slr1736* isoliert. Dieses Fragment wurde unter Anwendung von Standardmethoden in einen BamHI geschnittenen pBinAR-TkTp-9 ligiert (siehe Abbildung. 1) Dieses Plasmid (pBinAR-TkTp-9/*slr1736*) wurde zur Erzeugung transgener *Nicotiana tabacum* Pflanzen verwendet.

15 Fragment A (529 bp) in Abbildung 1 beinhaltet den 35S-Promotor des CaMV (Nukleotide 6909 bis 7437 des Blumenkohlmosaikvirus), Fragment B (245bp) Fragment kodiert für das Transitpeptid der *Nicotiana tabacum* Transketolase, Fragment C (944Bp) kodiert ORF 20 *slr1736* aus *Synechocystis spec. PCC 6803*, Fragment D (219Bp) kodiert für das Terminationssignal des Octopin-Synthase Gens.

Zur Erzeugung eines Plasmides, welches die samenspezifische Expression der Homogentisatphytyltransferase aus *Synechocystis spec. PCC 6803* in Pflanzen ermöglicht, wurde der samenspezifische Promotor des Legumin B4 Gens (Kafatos et al., Nuc. Acid. Res., 14(6):2707-2720, 1986) verwendet. Aus dem Plasmid pCR-Script/lePOCS wurde das 2,7 Kb Fragment des Legumin B4 Gen Promotors unter Verwendung der den Promotor 5' flankierenden 30 EcoR1 und der 3' flankierenden Kpn1 Schnittstellen isoliert. Das Plasmid pBinAR-TkTp-9/*slr1736* wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen EcoR1 und Kpn1 behandelt. Dies hatte zur Folge, daß der 35S-Promotor des CaMV aus diesem Plasmid herausgetrennt wurde. Der Promotor des Legumin Gens wurde anschließend 35 als EcoR1/Kpn1 Fragment in diesen Vektor kloniert, wodurch ein Plasmid erzeugt wurde, welches die Expression des Gen *slr1736* unter die Kontrolle dieses samenspezifischen Promotors stellte, siehe Abbildung 2 . Dieses Plasmid (pBinARleP-TkTp-9/*slr1736*) wurde zur Erzeugung transgener *Nicotiana tabacum* Pflanzen ver- 40 wendet.

Fragment A (2700 bp) in Abbildung 2 beinhaltet den Promotor des Legumin B4 Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (245bp) kodiert für das Transitpeptid der *Nicotiana tabacum* Transketolase, Fragment C 45 (944Bp) kodiert für den ORF *slr1736* aus *Synechocystis spec. PCC 6803*, Fragment D (219Bp) für das Terminationssignal des Octopin-Synthase Gens.

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Homogentisatphytyltransferase aus *Synechocystis spec.* PCC 6803 in *A.thaliana* und *B.napus*.

5 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-gener *A.thaliana* bzw. *B.napus* Pflanzen, die die Homogentisatphytyltransferase aus *Synechocystis spec.* PCC 6803 exprimieren, wurden die Vektoren pPTVkan35S-IPP-Tp-9OCS bzw. pPTVkanLeP-IPP-Tp-10NOS verwendet. Diese Vektoren sind Derivate des pGPTVkan  
 10 (D.Becker, E. Kemper, J. Schell, R. Masterson. *Plant Molecular Biology* 20: 1195-1197, 1992) denen das uidA Gen deletiert wurde. Stattdessen enthält der pPTVkan35S-IPP-Tp-9OCS den 35S-Promotor des CaMV (Blumenkohlmosaikvirus) (Franck et al., 1980) die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-  
 15 spezifischen Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) (Badur, unveröffentlicht) und das Terminationssignal des Octopin-Synthase Gens (Gielen et al., 1984)

Der Vektor pPTVkanLeP-IPP-Tp-10nos enthält den samenspezifischen  
 20 Promotor des Legumin B4 Gens (Kafatos et al., Nuc. Acid. Res., 14(6):2707-2720, 1986), ebenfalls die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) (Badur, unveröffentlicht) und das Terminationssignal der Nopalinsynthase aus  
 25 *A.tumefaciens* (Depicker et al., *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 561-73, 1982).

Die DNA Moleküle kodierend für den ORF slr1736 aus *Synechocystis spec.* PCC 6803 wurden als BamHI Fragmente mit durch die  
 30 T4-Polymerase aufgefüllten stumpfen Enden in die Vektoren pPTVkan35S-IPP-Tp-9OCS (Abb.3) bzw. pPTVkanLeP-IPP-Tp-10nos (Abb.4) kloniert, wodurch eine Translationsfusion mit dem Transitpeptid der IPP-2 erzeugt wurde. Somit konnte ein Import der Homogentisatphytyltransferase in die Plastiden gewährleistet  
 35 werden.

Fragment A (529 bp) in Abbildung 3 beinhaltet den 35S-Promotor des CaMV (Nukleotide 6909 bis 7437 des Blumenkohlmosaikvirus). Fragment B (205bp) Fragment kodierend für das Transitpeptid  
 40 der *A.thaliana* Isopentenylpyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (944 bp) ORF slr1736 aus *Synechocystis spec.* PCC 6803. Fragment D (219Bp) Terminationssignal des Octopin-Synthase Gens.

Fragment A (2700 bp) in Abbildung 4 beinhaltet den Promotor  
 45 des Legumin B4 Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (206bp) Fragment kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenylpyrophosphat-Isomerase-2., Fragment C (944Bp) kodiert für den ORF

slr1736 aus *Synechocystis* spec. PCC 6803. Fragment D (272Bp)  
für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens.

**Beispiel 6**

**5 Herstellung transgener *Arabidopsis thaliana* Pflanzen**

- Wildtyp *Arabidopsis thaliana* Pflanzen (Columbia) wurden mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm (GV3101 [pMP90]) auf Grundlage einer modifizierten Vacuumfiltrationsmethode transformiert
- 10 (Steve Clough und Andrew Bent. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *A.thaliana*. Plant J 16(6):735-43, 1998; der Bechtold, N. Ellis, J. und Pellier, G., in: *Planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants*. CRAcad Sci Paris, 1993, 15 1144(2):204-212). Die verwendeten *Agrobacterium tumefaciens* Zellen waren im Vorfeld mit den Plasmiden pPTVkan35SIPP-Tp9/slr1736 bzw. pPTVkanLePIPP-Tp9/slr1736 (Abbildung 3 und 4) transformiert worden.
- 20 Samen der Primärtransformanden wurden auf Grundlage der Antibiotikaresistenz selektioniert. Antibiotika resistente Keimlinge wurden in Erde gepflanzt und als vollentwickelte Pflanzen zur biochemischen Analyse verwendet.

**25 Beispiel 7**

**Herstellung transgener *Brassica napus* Pflanzen**

- Die Herstellung transgener Raps Pflanzen orientierte sich an einem Protokoll von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die Zusammensetzung der verwendeten Medien und Puffer angegeben ist.

Die Transformationen erfolgten mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 [pMP90]. Zur Transformation wurden die Plasmide pPTVkan35SIPP-Tp9/slr1736 bzw. pPTVkanLePIPP-Tp10/slr1736 verwendet (Abbildung 3 und 4). Samen von *Brassica napus* var. Westar wurden mit 70 % Ethanol (v/v) oberflächensteril gemacht, 10 Minuten bei 55°C in Wasser gewaschen, in 1 %iger Hypochlorit-Lösung (25 % v/v Teepol, 0,1 % v/v Tween 20) für 20 Minuten inkubiert und sechsmal mit sterilem Wasser für jeweils 20 Minuten gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glaskolben mit 15 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) wurden 45 die Wurzeln und Apices entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explantate wurden 30 Minuten mit 50 ml Basalmedium gewaschen und

in einem 300 ml Kolben überführt. Nach Zugabe von 100 ml Kallusinduktionsmedium wurden die Kulturen für 24 Stunden bei 100 U/min inkubiert.

- 5 Vom Agrobacterium Stamm wurde eine Übernachtkultur bei 29°C in Luria Broth-Medium mit Kanamycin (20 mg/l) angesetzt, davon 2 ml in 50 ml Luria Broth-Medium ohne Kanamycin für 4 Stunden bei 29°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der Kultur bei 2000 U/min für 25 min wurde das Zellpellet in  
10 25 ml Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wurde durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 eingestellt.

Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit  
15 sterilen Pipetten entfernt, 50 ml Agrobakterium-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die Agrobakterien-Suspension wurde entfernt, die Raps-Explante für 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung  
20 wurde für 24 h auf einem Rotationschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-Kultivierung wurde durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten  
25 wurde in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten entfernt.

Zur Regeneration wurden jeweils 20-30 Explante in 90 mm Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit  
30 Kanamycin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen Leukopor verschlossen und bei 25 °C und 2000 lux bei Photoperioden von 16 Stunden Licht/ 8 Stunden Dunkelheit inkubiert. Alle 12 Tage wurden die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit Sproß-Induktionsmedium umgesetzt. Alle weiteren  
35 Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen wurden wie von Bade, J.B und Damm, B. (in: Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.

#### 40 Beispiel 8

Herstellung transgener *Nicotiana tabacum* Pflanzen.

Zehn ml YEB-Medium mit Antibiotikum (5 g/l Rinder-Extrakt, 1 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l Pepton, 5 g/l Saccharose und 2 mM MgSO<sub>4</sub>)  
45 wurden mit einer Kolonie von *Agrobacterium tumefaciens* beimpft und über Nacht bei 28°C kultiviert. Die Zellen wurden 20 min bei 4°C, 3500 U/min in einer Tischzentrifuge pelletiert und danach in

30

frischem YEB-Medium ohne Antibiotika unter sterilen Bedingungen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für die Transformation eingesetzt.

- 5 Die Wildtyp-Pflanzen aus Sterilkultur wurden durch vegetative Replikation erhalten. Dazu wurde nur die Spitze der Pflanze abgeschnitten und auf frisches 2MS-Medium in ein steriles Einweckglas überführt. Vom Rest der Pflanze wurden die Haare auf der Blattoberseite und die Mittelrippen der Blätter entfernt. Die Blätter  
10 wurden mit einer Rasierklinge in etwa 1cm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten. Die Agrobakterienkultur wurde in eine kleine Petrischale überführt (Durchmesser 2 cm). Die Blattstücke wurden kurz durch diese Lösung gezogen und mit der Blattunterseite auf 2MS-Medium in Petrischalen (Durchmesser 9 cm) gelegt, so daß sie das  
15 Medium berührten. Nach zwei Tagen im Dunkeln bei 25°C wurden die Explantate auf Platten mit Kallusinduktionsmedium überführt und in der Klimakammer auf 28°C temperiert. Das Medium mußte alle 7-10 Tage gewechselt werden. Sobald sich Kalli bildeten, wurden die Explantate in sterile Einweckgläser auf Sproßinduktionsmedium  
20 mit Claforan (0,6 % BiTec-Agar (g/v), 2,0 mg/l Zeatinribose, 0,02 mg/l Naphtylessigsäure, 0,02 mg/l Gibberelinsäure, 0,25 g/ml Claforan, 1,6 % Glukose (g/v) und 50 mg/l Kanamycin) überführt. Nach etwa einem Monat trat Organogenese ein und die gebildeten Sprosse konnten abgeschnitten werden. Die Kultivierung der  
25 Sprosse wurde auf 2MS-Medium mit Claforan und Selektionsmarker durchgeführt. Sobald sich ein kräftiger Wurzelballen gebildet hatte, konnten die Pflanzen in Pikanterde getopft werden.

#### Beispiel 9

#### 30 Charakterisierung der transgenen Pflanzen.

Um zu bestätigen, daß durch die Expression der Homogentisatphytyltransferase aus *Synechocystis* spec. PCC 6803 die Vitamin E Biosynthese in den transgenen Pflanzen beeinflußt wird, werden  
35 die Tocopherol- und Tocotrienol-Gehalte in Blätter und Samen der mit den beschriebenen Konstrukten transformierten Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* und *Nicotiana tabacum*) analysiert. Dazu werden die transgenen Pflanzen im Gewächshaus kultiviert und Pflanzen die das Gen kodierend für die Homogen-  
40 tisatphytyltransferase aus *Synechocystis* spec. PCC 6803 exprimieren auf Northern-Ebene analysiert. In Blättern und Samen dieser Pflanzen wird der Tocopherolgehalt und der Tocotrienolgehalt ermittelt. In allen Fällen ist die Tocopherol- bzw. Tocotrienol-Konzentration in transgenen Pflanzen, die zusätzlich eine  
45 erfundungsgemäße Nukleinsäure exprimieren, im Vergleich zu nicht transformierten Pflanzen erhöht.

## Patentansprüche

1. Protein, das eine enzymatische Aktivität zur Umwandlung von  
5 Homogentisat und Phytyl-Pyrophosphat in 2-Methyl-Phytylhydro-  
chinon aufweist.
2. Protein nach Anspruch 1, enthaltend die Aminosäuresequenz  
SEQ ID NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution,  
10 Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz,  
die eine Homologie von mindestens 20 % auf Aminosäureebene  
mit der Sequenz SEQ ID NO. 2 aufweist.
3. Nukleinsäure, codierend ein Protein gemäß einem der  
15 Ansprüche 1 oder 2.
4. Nukleinsäure gemäß Anspruch 3, codierend ein Protein aus  
Pflanzen, Cyanobakterien, Moose oder Algen.
- 20 5. Nukleinsäure nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß  
sie aus der in SEQ ID NO 1 dargestellten Sequenz besteht.
6. Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend eine Nukleinsäure gemäß  
einem der Ansprüche 3 bis 5, die mit einem oder mehreren  
25 Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die  
Transkription und Translation in prokaryontischen oder  
eukaryontischen Organismen gewährleisten.
7. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 6, dadurch gekenn-  
30 zeichnet, daß die Regulationssignale einen oder mehrere  
Promotoren enthalten, die die Transkription und Translation  
in prokaryontischen oder eukaryontischen Organismen gewähr-  
leisten.
- 35 8. Genetisch veränderter Organismus, wobei die genetische  
Veränderung die Genexpression einer Nukleinsäure gemäß einem  
der Ansprüche 3 bis 5 gegenüber einem Wildtyp  
  
für den Fall, daß der Ausgangsorganismus eine Nukleinsäure  
40 gemäß einem der Ansprüche 3 bis 5 enthält, erhöht oder  
  
für den Fall, daß der Ausgangsorganismus eine Nukleinsäure  
gemäß einem der Ansprüche 3 bis 5 nicht enthält, verursacht.

9. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der genetisch veränderte Organismus gegenüber dem Wildtyp einen erhöhten Vitamin E-Gehalt aufweist.
- 5 10. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der genetisch veränderte Organismus gegenüber Inhibitoren der Homogentisatphytyltransferase eine Resistenz aufweist.
- 10 11. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organismus einen eukaryontischen Organismus verwendet.
- 15 12. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man als eukaryontischen Organismus eine Pflanze verwendet.
- 20 13. Verwendung eines genetisch veränderten Organismus nach einem der Ansprüche 8 bis 12 zur Herstellung von Vitamin E oder zur Biotransformation von Homogentisatderivaten und Phytyl-Pyro-phosphat-Derivaten in 2-Methyl-Phytylhydrochinonderivate oder Homogentisatderivaten und Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-derivaten in 2-Methyl-geranylgeranylhydrochinonderivate.
- 25 14. Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen gemäß einem der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 3 bis 5 oder ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 6 oder 7 in das Genom des Ausgangsorganismus einführt.
- 30 15. Verwendung der Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 3 bis 5 oder der Nukleinsäurekonstrukte gemäß Anspruch 6 oder 7 zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen.
- 35 16. Verwendung der Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 3 bis 5 zur Expression in Organismen.
- 40 17. Verfahren zur Herstellung von Vitamin E, dadurch gekennzeichnet, daß man Homogentisatderivate und Phytyl-Pyrophosphat-Derivate in 2-Methyl-Phytylhydrochinonderivate oder Homogen-tisatderivate und Geranyl-Geranyl-Pyrophosphatderivate in 2-Methyl-geranylgeranylhydrochinonderivate in Gegenwart eines Proteins gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2 überführt.

## 33

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Organismus gemäß einem der Ansprüche 8 bis 12 kultiert, den Organismus erntet und die Vitamin-E-Verbindungen anschließend aus dem Organismus isoliert.
- 5           19. Verfahren zur Biotransformation, dadurch gekennzeichnet, daß man Homogentisatderivate und Phytyl-Pyrophosphat-Derivate in 2-Methyl-Phytylhydrochinonderivate oder Homogentisatderivate und Geranyl-Geranyl-Pyrophosphatderivate in 2-Methyl-geranyl-geranylhydrochinonderivate in Gegenwart eines Proteins gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2 überführt.
- 10           20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein in einem Organismus, in freier oder in immobilisierter Form vorliegt.
- 15           21. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 oder 2 als Homogen-tisatphytyltransferase.
- 20           22. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 oder 2 zur Umwandlung von Homogentisatderivaten und Phytyl-Pyrophosphat-Derivaten in 2-Methyl-Phytylhydrochinonderivate oder Homogentisat-derivaten und Geranyl-Geranyl-Pyrophosphatderivaten in 2-Methyl-geranylgeranylhydrochinonderivate.
- 25           23. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 oder 2 oder der Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 3 bis 5 zur Herstellung von Vitamin E.
- 30           24. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 oder 2 oder der Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 3 bis 5 zur Herstellung von Vitamin E in transgenen Organismen.
- 35           25. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 oder 2 oder der Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 3 bis 5 zur Herstellung von Vitamin E in transgenen Pflanzen.
- 40           26. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 oder 2 oder der Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 3 bis 5 zur Herstellung von Antikörpern.
- 45           27. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 oder 2 oder der Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 3 bis 5 als herbizides Target zum Auffinden von Inhibitoren der Homogen-tisatphytyl-transferase.

34

28. Verfahren zum Auffinden von Inhibitoren der Homogentisatphytyltransferase, dadurch gekennzeichnet, daß man die enzymatische Aktivität der Homogentisatphytyltransferase in Gegenwart einer chemischen Verbindung misst und bei  
5 Erniedrigung der enzymatischen Aktivität im Vergleich zur nicht gehemmten Aktivität die chemische Verbindung einen Inhibitor darstellt.
29. Herbizide Wirkstoffe, erhältlich durch einen Verfahren gemäß  
10 Anspruch 28.

15

20

25

30

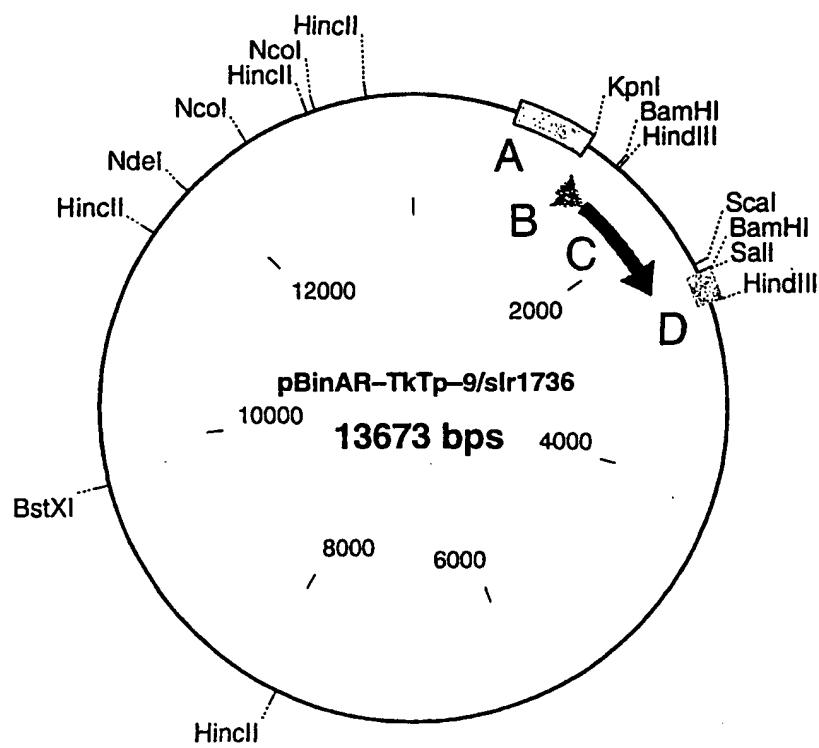
35

40

45

Val Gly Leu Cys Gly Val Ala Ser Leu Ala Ile Ala Trp Gly Leu Gly			
100	105	110	
ctc tgg ctg ggg cta acg gtg ggc att agt ttg att att ggc acg gcc	384		
Leu Trp Leu Gly Leu Thr Val Gly Ile Ser Leu Ile Ile Gly Thr Ala			
115	120	125	
tat tcg gtg ccg cca gtg agg tta aag cgc ttt tcc ctg ctg gcg gcc	432		
Tyr Ser Val Pro Pro Val Arg Leu Lys Arg Phe Ser Leu Leu Ala Ala			
130	135	140	
ctg tgt att ctg acg gtg cgg gga att gtg gtt aac ttg ggc tta ttt	480		
Leu Cys Ile Leu Thr Val Arg Gly Ile Val Val Asn Leu Gly Leu Phe			
145	150	155	
tta ttt ttt aga att ggt tta ggt tat ccc ccc act tta ata acc ccc	528		
Leu Phe Phe Arg Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Pro Thr Leu Ile Thr Pro			
160	165	170	175
atc tgg gtt ttg act tta ttt atc tta gtt ttc acc gtg gcg atc gcc	576		
Ile Trp Val Leu Thr Leu Phe Ile Leu Val Phe Thr Val Ala Ile Ala			
180	185	190	
att ttt aaa gat gtg cca gat atg gaa ggc gat cgg caa ttt aag att	624		
Ile Phe Lys Asp Val Pro Asp Met Glu Gly Asp Arg Gln Phe Lys Ile			
195	200	205	
caa act tta act ttg caa atc ggc aaa caa aac gtt ttt cgg gga acc	672		
Gln Thr Leu Thr Leu Gln Ile Gly Lys Gln Asn Val Phe Arg Gly Thr			
210	215	220	
tta att tta ctc act ggt tgt tat tta gcc atg gca atc tgg ggc tta	720		
Leu Ile Leu Leu Thr Gly Cys Tyr Leu Ala Met Ala Ile Trp Gly Leu			
225	230	235	
tgg gcg gct atg cct tta aat act gct ttc ttg att gtt tcc cat ttg	768		
Trp Ala Ala Met Pro Leu Asn Thr Ala Phe Leu Ile Val Ser His Leu			
240	245	250	255
tgc tta tta gcc tta ctc tgg tgg cgg agt cga gat gta cac tta gaa	816		
Cys Leu Leu Ala Leu Leu Trp Trp Arg Ser Arg Asp Val His Leu Glu			
260	265	270	
agc aaa acc gaa att gct agt ttt tat cag ttt att tgg aag cta ttt	864		
Ser Lys Thr Glu Ile Ala Ser Phe Tyr Gln Phe Ile Trp Lys Leu Phe			
275	280	285	
ttc tta gag tac ttg ctg tat ccc ttg gct ctg tgg tta cct aat ttt	912		
Phe Leu Glu Tyr Leu Leu Tyr Pro Leu Ala Leu Trp Leu Pro Asn Phe			
290	295	300	

Figure 1



Figur 2

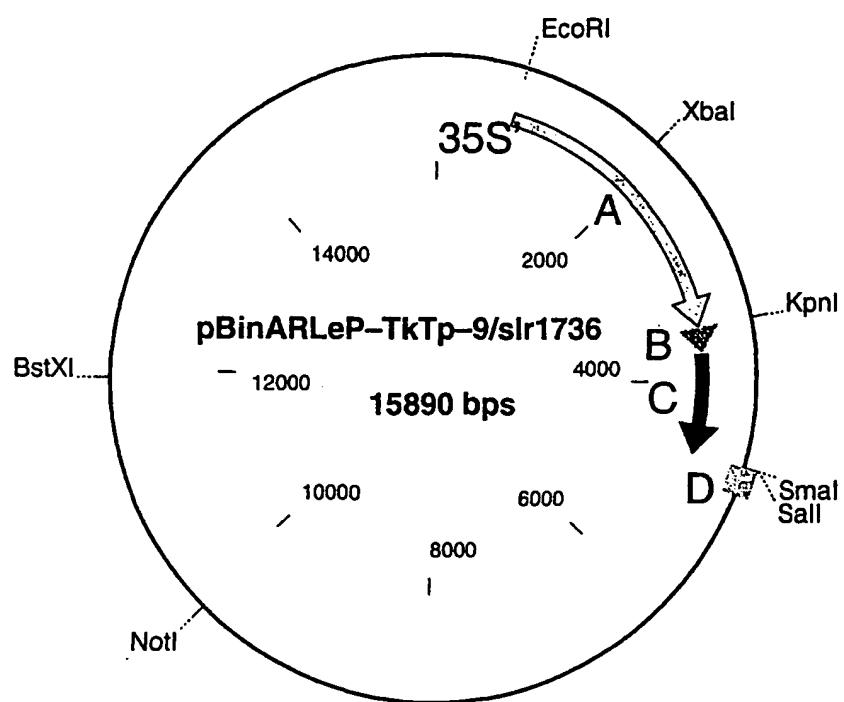
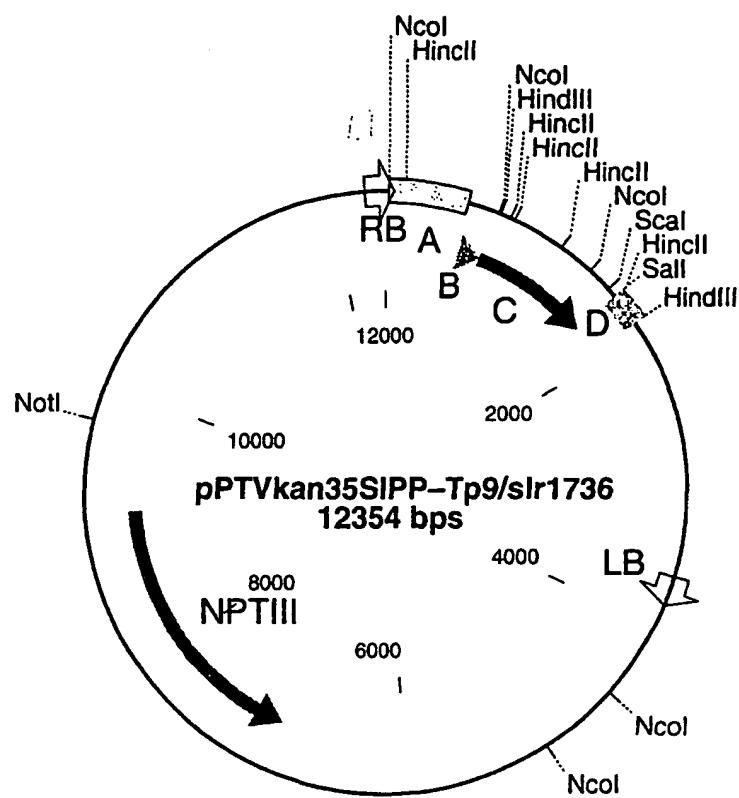
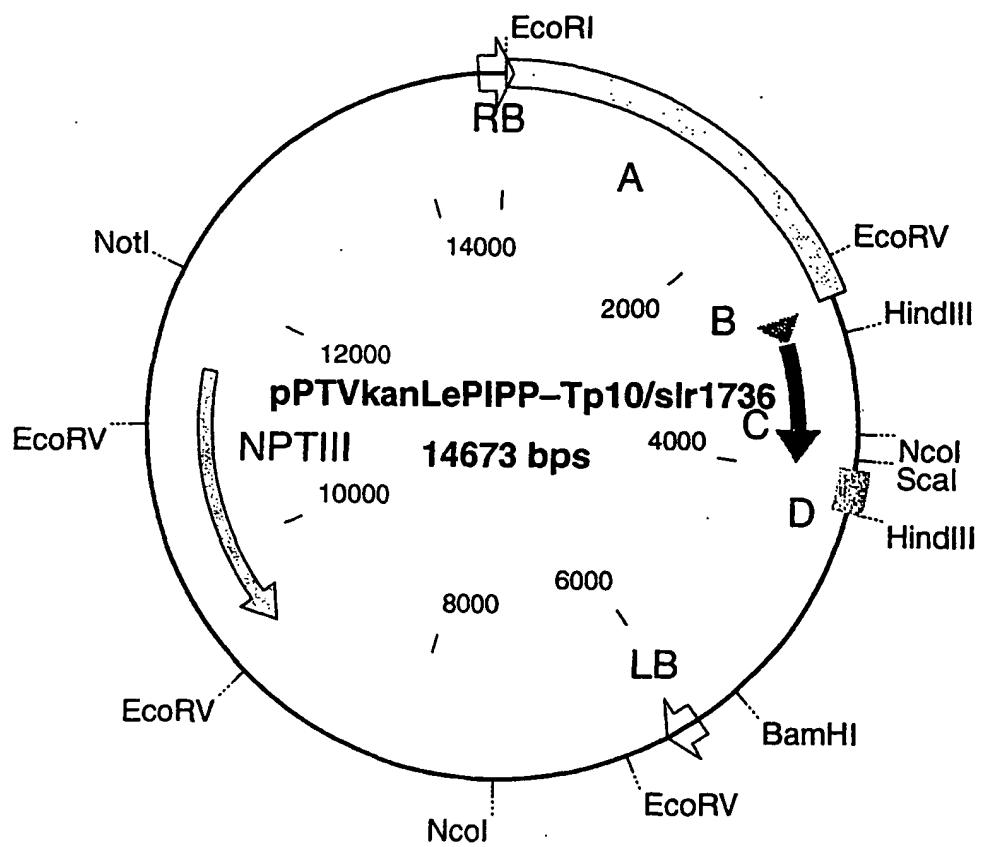


Figure 3



Figur 4



Figur 5

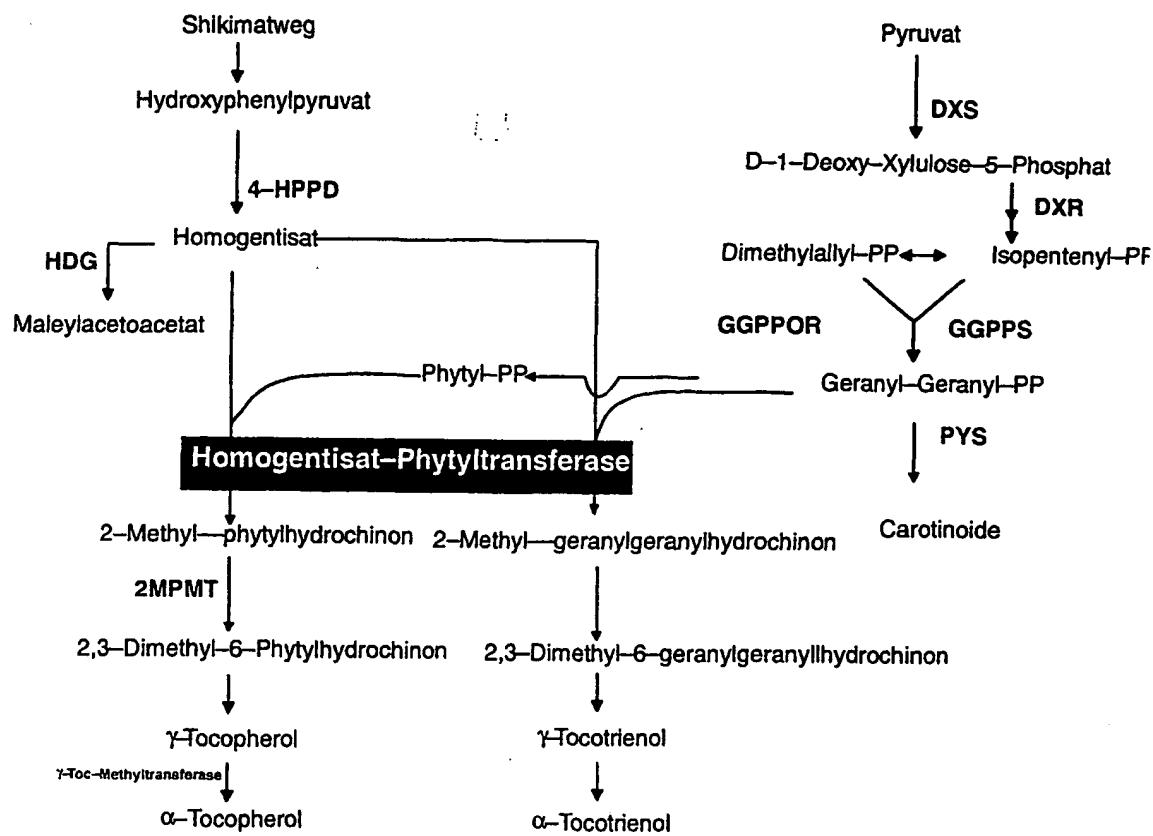
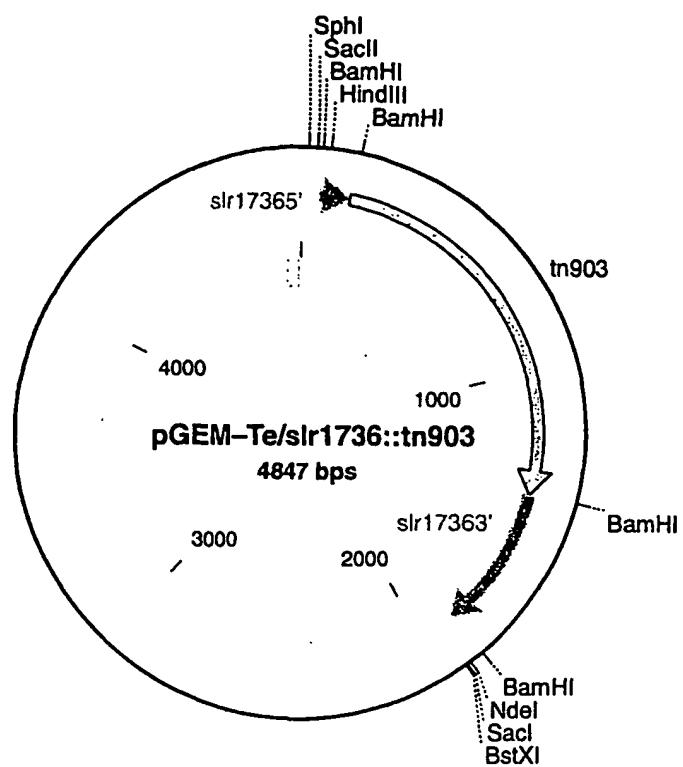


Figure 6



**Figur 7****Sequenz Beschreibung: slr1736****Sequenz Charakteristiken:****Länge: 944 Bp****Typ: Nukleinsäure****Topologie: linear****Beschreibung: ORF des hypothetischen Proteins slr1736 aus *Synechocystis spec. PCC 6803*****Großbuchstaben: Sequenz des ORF slr1736****Kleinbuchstaben: durch PCR addierte BamHI Restriktionsschnittstellen**

```
ggatccGCCATGGCAACTATCCAAGCTTTGGCGCTTCTCCGCCCTACCATCATTGGTACAACCTCTGAGCGTCTG  
GGCTGTGTATCTGTTAACTATTCTCGGGGATGGAAACTCAGTTAACCCCCCTGCTTCCCTGGATTAGTGTTGGCGCTT  
GGCTGGCCTGCCTGTTGGTAATGTGTACATTGTCGGCCTCAACCAATTGTGGGATGTGGACATTGACCGCATCAATAAG  
CCGAATTGGCCCTAGCTAACGGAGATTTCTATGCCCAAGGGCGTTGGATTGTGGACTTTGTGGCTTGCTTCCCTT  
GGCGATCGCCTGGGATAGGCTATGGCTGGGCTAACGGTGGGATTAGTTGATTGGCACGGCTATTGGTGC  
CGCCAGTGAGGTTAAAGCGCTTCCCTGCTGGCGCCCTGTGTATTCTGACGGTGCGGGAAATTGTGGTTAACCTGGG  
TTATTTTTATTTTTAGAATTGGTTAGGTTATCCCCCACTTTAATAACCCCCATCTGGTTTGACTTTATTTATCTT  
AGTTTTCACCGTGGGATGCCATTAAAGATGTCCAGATATGGAAGGCGATCGCAATTAAAGATTCAAACCTTAA  
CTTTGCAAATCGGCAAACAAAACGTTTCTGGGAACCTTAATTACTCACTGGTTGTTATTAGCCATGGCAATCTGG  
GGCTTATGGCGGCTATGCCCTAAATACTGCTTCTGATTGTTCCCATTGTGCTTATTAGCCTTACTCTGGTGGCG  
GAGTCGAGATGTACACTTAGAAAGCAAACCGAAATTGCTAGTTTATCAGTTATTGGAAGCTATTTCCTTAGAGT  
ACTTGCTGTATCCCTGGCTCTGTGGTACCTAATTCTAATACTATTAGGGggatcc
```

**Figur 8**

**Sequenz Beschreibung: slr17365'**

**Sequenz Charakteristiken:**

**Länge: 26 Bp**

**Typ: Nukleinsäure**

**Topologie: linear**

**Beschreibung: Oligonukleotid**

**5' -GGATCCGCCATGGCAACTATCCAAGC -3'**

**Figur 9**

**Sequenz Beschreibung:** slr17363'

**Sequenz Charakteristiken:**

**Länge:** 25 Bp

**Typ:** Nukleinsäure

**Topologie:** linear

**Beschreibung:** Oligonukleotid

5' -GGATCCCCCTAAAAAATAGTATTAG -3'

**1**

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; SunGene GmbH &amp; Co KgaA

&lt;120&gt; Homogentisatphytyltransferase

&lt;130&gt; 0817/00012

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn Vers. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 932

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Synechocystis PCC6803

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (4)...(930)

&lt;400&gt; 1

gcc atg gca act atc caa gct ttt tgg cgc ttc tcc cgc ccc cat acc	48
Met Ala Thr Ile Gln Ala Phe Trp Arg Phe Ser Arg Pro His Thr	
1                   5                   10                   15	

atc att ggt aca act ctg agc gtc tgg gct gtg tat ctg tta act att	96
Ile Ile Gly Thr Thr Leu Ser Val Trp Ala Val Tyr Leu Leu Thr Ile	
20                   25                   30	

ctc ggg gat gga aac tca gtt aac tcc cct gct tcc ctg gat tta gtg	144
Leu Gly Asp Gly Asn Ser Val Asn Ser Pro Ala Ser Leu Asp Leu Val	
35                   40                   45	

ttc ggc gct tgg ctg gcc tgc ctg ttg ggt aat gtg tac att gtc ggc	192
Phe Gly Ala Trp Leu Ala Cys Leu Leu Gly Asn Val Tyr Ile Val Gly	
50                   55                   60	

ctc aac caa ttg tgg gat gtg gac att gac cgc atc aat aag ccg aat	240
Leu Asn Gln Leu Trp Asp Val Asp Ile Asp Arg Ile Asn Lys Pro Asn	
65                   70                   75	

ttg ccc cta gct aac gga gat ttt tct atc gcc cag ggc cgt tgg att	288
Leu Pro Leu Ala Asn Gly Asp Phe Ser Ile Ala Gln Gly Arg Trp Ile	
80                   85                   90                   95	

gtg gga ctt tgt ggc gtt gct tcc ttg gcg atc gcc tgg gga tta ggg	336
---	-----

The PTO did not receive the following  
 listed item(s). Pf-2 of seq. list 17

tct aat act att ttt tag gg		932
Ser Asn Thr Ile Phe		
305		
<210> 2		
<211> 308		
<212> PRT		
<213> Synechocystis PCC6803		
<400> 2		
Met Ala Thr Ile Gln Ala Phe Trp Arg Phe Ser Arg Pro His Thr Ile		
1	5	10
		15
Ile Gly Thr Thr Leu Ser Val Trp Ala Val Tyr Leu Leu Thr Ile Leu		
20	25	30
Gly Asp Gly Asn Ser Val Asn Ser Pro Ala Ser Leu Asp Leu Val Phe		
35	40	45
Gly Ala Trp Leu Ala Cys Leu Leu Gly Asn Val Tyr Ile Val Gly Leu		
50	55	60
Asn Gln Leu Trp Asp Val Asp Ile Asp Arg Ile Asn Lys Pro Asn Leu		
65	70	75
		80
Pro Leu Ala Asn Gly Asp Phe Ser Ile Ala Gln Gly Arg Trp Ile Val		
85	90	95
Gly Leu Cys Gly Val Ala Ser Leu Ala Ile Ala Trp Gly Leu Gly Leu		
100	105	110
Trp Leu Gly Leu Thr Val Gly Ile Ser Leu Ile Ile Gly Thr Ala Tyr		
115	120	125
Ser Val Pro Pro Val Arg Leu Lys Arg Phe Ser Leu Leu Ala Ala Leu		
130	135	140
Cys Ile Leu Thr Val Arg Gly Ile Val Val Asn Leu Gly Leu Phe Leu		
145	150	155
		160
Phe Phe Arg Ile Gly Leu Gly Tyr Pro Pro Thr Leu Ile Thr Pro Ile		
165	170	175
Trp Val Leu Thr Leu Phe Ile Leu Val Phe Thr Val Ala Ile Ala Ile		
180	185	190
Phe Lys Asp Val Pro Asp Met Glu Gly Asp Arg Gln Phe Lys Ile Gln		
195	200	205

Thr Leu Thr Leu Gln Ile Gly Lys Gln Asn Val Phe Arg Gly Thr Leu  
210 215 220

Ile Leu Leu Thr Gly Cys Tyr Leu Ala Met Ala Ile Trp Gly Leu Trp  
225 230 235 240

Ala Ala Met Pro Leu Asn Thr Ala Phe Leu Ile Val Ser His Leu Cys  
245 250 255

Leu Leu Ala Leu Leu Trp Trp Arg Ser Arg Asp Val His Leu Glu Ser  
260 265 270

Lys Thr Glu Ile Ala Ser Phe Tyr Gln Phe Ile Trp Lys Leu Phe Phe  
275 280 285

Leu Glu Tyr Leu Leu Tyr Pro Leu Ala Leu Trp Leu Pro Asn Phe Ser  
290 295 300

Asn Thr Ile Phe  
305

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(26)

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz:Primer

<400> 3

ggatccgcca tggcaactat ccaagc

26

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(25)

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz:Primer

<400> 4

ggatccccct aaaaaatagt attag

25